

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIKROORGANIZMI U FORENZICI
MICROORGANISMS IN FORENSIC SCIENCE
SEMINARSKI RAD

Antonija Mamić

Preddiplomski studij biologije

(Undergraduate Study of Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Tomislav Ivanković

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. POVIJEST FORENZIKE	3
3. PODJELA MIKROORGANIZAMA	5
4. BAKTERIJE U FORENZICI.....	6
4.1. <i>ACTINOBACTERIA</i>	6
4.2. <i>FIRMICUTES</i>	7
4.3. <i>PROTEOBACTERIA</i>	9
5. UTAPANJE I DIJATOMEJE	10
6. GLJIVE U FORENZICI	12
7. PRIKUPLJANJE UZORAKA	14
8. PROCJENA POST MORTEM INTERVALA	15
9. BIOTERORIZAM.....	17
10. ZAKLJUČAK	19
11. LITERATURA.....	20
12. SAŽETAK.....	23
13. SUMMARY	23

1. UVOD

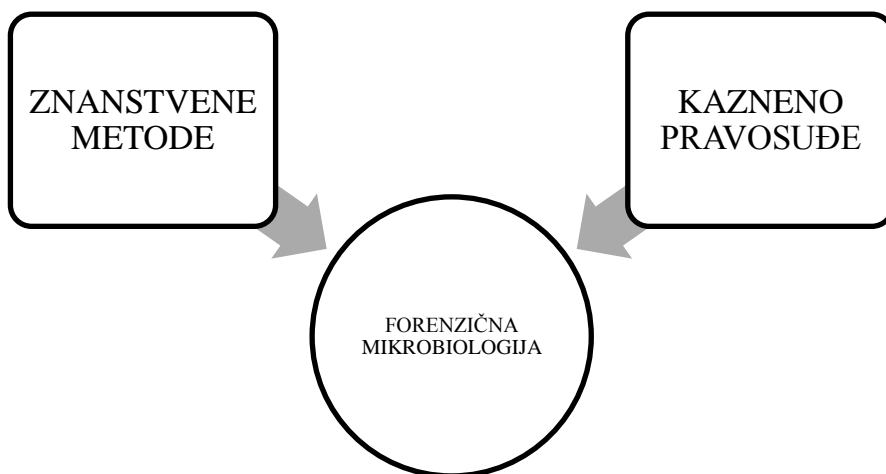
Mikrobiologija proučava organizme teško vidljive golim okom. Mikroorganizmi ili mikrobi je skupni naziv za bakterije, arheje, gljive i protiste. Mikroorganizmi se upotrebljavaju kao fizički dokazi u forenzičnim istraživanjima. Koriste se pri rekonstruiranju događaja u raznim slučajevima ubojstva, trovanju hranom i bioterorizmu. Razna primjena mikroorganizama je definicija moderne forenzične mikrobiologije. Razvoj moderne tehnologije omogućio je forenzičnim znanstvenicima otkrivanje novih tragova zločina. Korištenje informacijama o mikrobiološkim zajednicama u forenzičnim istraživanjima otvoreno je novo područje kojim se olakšavaju napori u rješavanju zločina (Carter i sur. 2017).

Riječ *forenzika* dolazi od latinske riječi *forensic* (na trgu) koja je izvedenica od latinske riječi *forum* (trg). Kada je u antičkom Rimu osoba preminula, a nije se znao točan uzrok smrti, trupla su izlagana na trgu kako bi ih stručnjaci mogli pregledati i dati svoje mišljene o uzroku smrti.

Forenzičnim znanostima nazivamo znanstvene discipline koje svojim metodama pomažu pravosuđu pri rješavanju stručnih pitanja. Moderne forenzične znanosti počinju se razvijati u 18. i 19. stoljeću. Ocem moderne toksikologije smatra se Matheu Orfilia koji je dokazao da je osoba ubijena trovanjem. Krajem 19. stoljeća Cesare Lombroso pokušao je antropološki odrediti biološki profil kriminalca, na temelju glave, čela i ušiju. Ta saznanja iskoristio je Alphonse Bertillion, te je napravio osnovu za razvoj forenzične fotografije. Za razvoj forenzične mikrobiologije odgovoran je Robert Koch koji je istraživao bakteriju *Bacillus anthracis*, uzročnik antraksa. Značajnija istraživanja su započeta nakon biološkog napada sporama antraksa u pismu, 2001. godine na senatora Sjedinjenih Američkih Država (Beecher, 2006).

Forenzična mikrobiologija je simbioza između primjene znanstvenih metoda i sustava kaznenog pravosuđa i relativno je novo polje proučavanja. Od mikroorganizama se očekuje da

daju uvid u napade kemijskim oružjem, uzroke i vrijeme smrti, te pružaju dokaze u slučajevima kao što su seksualno zlostavljanje i nesavjesno liječenje pacijenta. Mikroorganizmi se mogu koristiti i za određivanje uzroka smrti. Ovaj rad obuhvaća važnost mikrobioloških dokaza u kaznenim predmetima.



Grafikon 1. Forenzična znanost kao simbioza znanstvene metode i kaznenog pravosuđa

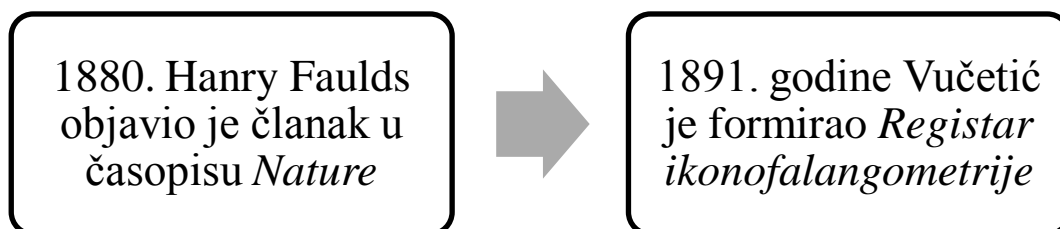
2. POVIJEST FORENZIKE

Kina je država koja je prva prepoznala vrijednost forenzičnih znanosti u identifikaciji zločina. Prvi su prepoznali da se ljudi razlikuju po otisku prstiju, ali nisu dobro razradili klasifikaciju. Prva osoba koja je prepoznala da se otisci prstiju mogu podijeliti u kategorije je Jan Purkinje, profesor anatomije. Godine 1880., škotski fizičar Hanry Faulds objavio je članak u časopisu *Nature* koji govori da svaka osoba ima različiti otisak prstiju. Ovo otkriće ubrzo su iskoristili mnogi znanstvenici koji su razvili tehniku analiziranja otisaka, jedan od njih je Hrvat, Ivan Vučetić (Slika1.). Vučetić je formirao *Registar ikonofalangometrije*, time je osnovana prva desetoprstna zbirka. Primijenivši svoju metodu identifikacije u praksi, riješio je prvi slučaj, Franciske Rojas koja je optužila ljubavnika za ubojstvo svoje dvoje djece. Vučetić je daktiloskopirao majku i usporedio njezine otiske prstiju s pronađenim krvavim otiscima prstiju na drvenom okviru vrata, te potvrdio da su identični. Vučetićeov sustav klasifikacije otisaka prstiju danas se još koristi u Južnoj Americi, a u Sjevernoj Americi i Europi koristi se sustav klasifikacije Edwarda Henryja.



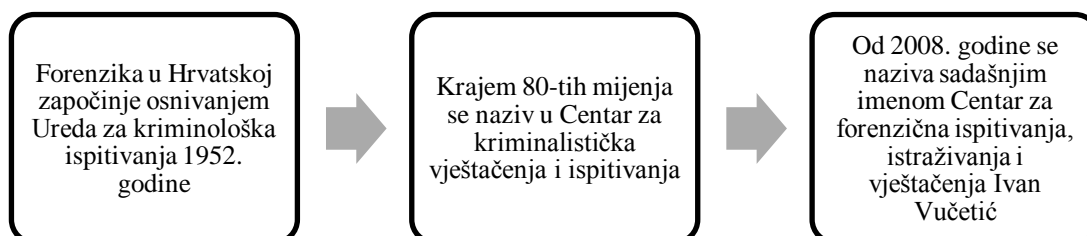
Slika 1. Ivan Vučetić (<http://www.forenzika.hr/>)

Prva detektivska tvrtka otvorena je u Francuskoj, 1810. godine, a zvala se *The Surete of Paris*. Predsjednik Teddy Roosevelt osniva FBI koji je počeo s radom tek 1932. Prvi kriminalistički laboratorij osnovao je profesor forenzične medicine Edmund Locard je u Francuskoj 1910. godine.



Grafikon 2. Posljedično otkriće Hanryja Fauldsa

Forenzika u Hrvatskoj započinje osnivanjem Ureda za kriminološka ispitivanja 1952. godine. Do tada je kriminalističke istrage vodilo javno tužilaštvo. Ured je osnovao dr. Tomislav Marković, a zadaća Ureda je bila stvaranje uvjeta za uvođenje suvremenijih kriminalističkih metoda i ispitivanja s ciljem suzbijanja kriminala. Krajem 80-tih mijenja se naziv u Centar za kriminalistička vještačenja i ispitivanja. Od 2008. godine se naziva sadašnjim imenom Centar za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja Ivan Vučetić, spomenutog u ranijem tekstu. Sveučilište u Splitu, 2008. Godine, osnovalo je Podružnicu - „Sveučilišni studijski centar za forenzične znanosti“. Naziv Podružnice promijenjen je 26. rujna 2011. i od tada glasi „Sveučilišni odjel za forenzične znanosti“. Završetkom diplomskog sveučilišnog studija Forenzike, stječe se akademski naziv magistra / magistar forenzike. Studij je podijeljen na četiri modula: istraživanje mjesta zločina, forenzična kemija i molekularna biologija, forenzika i nacionalne sigurnosti, te financijsko-računovodstvena forenzika. Na navedenim modulima studenti se osposobljavaju za iznimno atraktivna i ugledna zanimanja iz područja forenzike za kojima potražnja u svjetskim okvirima neprestano raste (<http://forenzika.unist.hr/>).



Grafikon 3. Razvoj forenzike u Hrvatskoj

3. PODJELA MIKROORGANIZAMA

Morfološki bakterije se dijele na štapićaste (bacilli), okruglaste (koki), savijene (vibroni), spiralne (spirili) i dr. Karakteristična bakterijska stanica sastoji se od citoplazme, ribosoma, nukleoida, plazmida, te je sve omeđeno citoplazmatskom membranom i staničnom stijenkom koju obavija sluzavi omotač ili kapsula. Sadrže bič za pokretanje i pili, koji im pomažu pri pričvršćivanju za podlogu.

Virusi se razlikuju po mnogim karakteristikama, a najfundamentalnija je razlika u njihovom genomu. Prema tradicionalnoj podjeli viruse dijelimo na biljne, animalne i bakterijske. Svaki virus sadrži DNA ili RNA molekulu koja je okružena proteinskim omotačem, te neki imaju dodatni omotač građen od proteina, lipida i ugljikohidrata. Virus su najrasprostranjeniji biološki entiteti na zemlji. Igraju znatnu ulogu u globalnoj ekologiji jer su ogroman izvor genetičke raznolikosti, utječu na sastav i evoluciju domaće populacije, te utječu na kruženje kemijskih elemenata u okolišu.

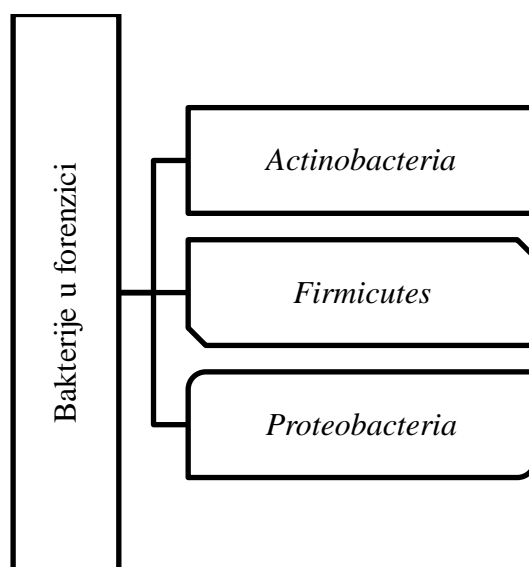
Alge kremenjašice (ili dijatomeje-doslovno znači „izrezane na dvije“) su jednostanični organizmi čija je stanična stijenka zamijenjena dvjema pločicama od silicijevog dioksida (kremena), a svaka vrsta je specifična s obzirom na položaj i oblik tekstura na kremenoj ljušturici. Dijatomeje se najviše koriste u forenzičkoj znanosti pri otkrivanju zločina, povezivanju krivca s mjestom zločina ili eliminiranju osumnjičenih osoba. Prvenstveno zbog svoje jedinstvene građe, velike raznolikosti vrsta, te činjenice da su kao materijal vjerodostojne, mogu biti multifunkcionalan dokaz jer se pojavljuju u određenim ekosustavima u određeno vrijeme, a njihove ljušturice nisu podložne raspadanju ili razgradnji. Kao materijalni dokaz u forenzici dijatomeje se najviše koriste u slučajevima utapanja osoba.

Carstvo gljiva u obuhvaća organizme koji se hrane heterotrofnom apsorpcijom, imaju stanične stijenke građene od hitina i β -glukana, imaju mitohondrije. Osim manjeg broja jednostaničnih vrsta, gljive imaju nitasto, razgranato tijelo *micelij*. Gljive se razmnožavaju spolno ili nesporno. Najveći broj vrsta tvori mikroskopske ili makroskopske organe (plodišta), na kojima nastaju spore. Plodišta se razvijaju u povoljnim vremenskim uvjetima i najčešće traju razmjerno kratko. Manji broj vrsta razvija višegodišnja plodišta. Većina se vrsta širi

sporama (nastalima u spolnom ili nespolnom ciklusu) koje raznosi vjetar. Gljive imaju iznimno značajnu ulogu u odvijanju ekoloških procesa u kopnenim ekosustavima, posebno u šumskim. Razgrađujući mrtvu org. tvar omogućavaju kruženje materije. Grana biologije koja proučava gljive naziva se *mikologija*.

4. BAKTERIJE U FORENZICI

U posljednje vrijeme ekologija mikroorganizama postaje sve bitniji dokaz u istraživanju ubojstva (Fierer i sur. 2010; Lax i sur. 2015). Ova istraživanja su identificirala mnoge bakterije iz nekoliko redova, no najčešće se spominju bakterije reda: *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*.



Grafikon 4. Podjela forenzičnih bakterija bazirana na ovom radu

4.1. ACTINOBACTERIA

U ovom radu *Actinobacteria* će biti podijeljeni u 3 grupe: korineformne bakterije, bakterije propionskog vrenja i nitaste bakterije.

Korineformne bakterije dobile su ime po grčkoj riječi *corōnē*, što označava njihov štapićasti oblik gdje je jedan kraj veći od drugoga (poput čvora). One su gram-pozitivni, aerobni, nepokretni. Žive u tlu, hrani i na ljudskoj koži. Najpoznatiji rodovi u grupi su: *Arthrobacter*, *Corynebacterium* i *Kurthia*. Vrsta *Corynebacterium glutamicum* proizvodi

mononatrijev- glutaminat koji se koristi u proizvodnji hrane kao pojačivač okusa pa je od ekonomskog značaja. Bakterije roda *Arthrobacter* su gram-varijabilne bakterije, najčešće aerobne. Zanimljivo je da neke mogu razgraditi herbicide, pesticide, nikotin, kofein i fenol (Madigan i sur. 2012). Brojnost korineformnih bakterija je relativno konstantna tijekom života jer preživljavaju u nepovoljnim uvjetima.

Bakterije iz roda *Propionibacterium* su gram-pozitivne, anaerobne, te fermentiraju mliječnu kiselinu, mogu koristiti i mliječnu kiselinu, koja je produkt fermentacije drugih bakterija, te se stoga ova metabolička strategija naziva sekundarna fermentacija (Madigan i sur. 2012). U forenzici ih povezujemo s uzorcima prikupljenim iz oralne šupljine, kože, na mjestima gdje se nalaze žlijezde lojnice (nastanak akni). Svaki čovjek ima drugačiju zajednicu bakterija u ustima što se može koristiti u identifikaciji. Prilikom ugriza na žrtvi možemo odrediti tko je počinitelj analizom bakterija iz njegovih usta i onih uzetih na mjestu ugriza.

Bakterije koje stvaraju nitaste hife slične hifama gljiva, nazivamo nitaste bakterije. Žive u bazičnim ili neutralnim tlima, lako preživljavaju u sušim uvjetima zbog hifa kojima crpe vodu i hranjive tvari iz dubljih slojeva zemlje koji nisu dostupni drugim organizmima. Najpoznatiji su rodovi *Streptomyces* i *Actinomyces* (Carter i sur. 2017). Zanimljivo je da ove bakterije stvaraju antibiotike kao što su streptomycin, spectinomycin, clindamycin i drugi. Više od 60 vrsta ovih antibiotika upotrebljava se u ljudskoj i veterinarskoj medicini, te su bitan dokaz u obdukciji (Madigan i sur. 2012) jer ovi antibiotici uništavaju druge bakterije pa se razgradnja leša usporava jer preživljavaju samo određene bakterije.

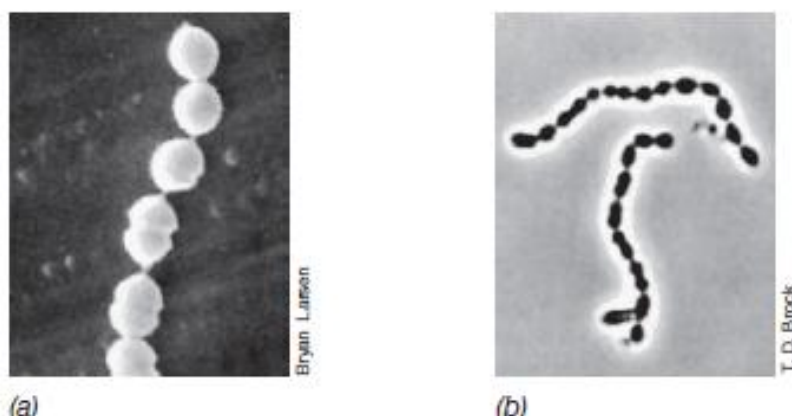
4.2. FIRMICUTES

Firmicutes su jedna od glavnih bakterijskih koljena. Stanovnici su ljudske kože, sluznice i gastrointestinalnog trakta, te ih se još može naći u tlu i sedimentu. U odlomku su podijeljeni u tri glavne grupe: sporogene bakterije, bakterije mliječno–kiselog vrenja i ostale.

Sporogene bakterije su bakterije koje imaju sposobnost stvaranja spora. Endospore omogućavaju preživljavanje u uvjetima ekstremnih temperatura, suša ili manjku hranjivih tvari. Najpoznatiji rod je *Bacillus*, čije su vrste aerobi ili fakultativni anaerobi i rod *Clostridium*, koji su obavezni anaerobi. Rod *Bacillus* je prepoznatljiv po endosporama ovalnog ili duguljastog oblika. Jedna od najpoznatijih bakterija ovog roda je *Bacillus anthracis*, uzročnik antraksa, čije su se spore koristile kao biooružje. Naime, ako *B. anthracis*

postavimo u nepovoljne uvjete formirat će se endospore koje se mogu lako prenijeti, na primjer u omotnici pisma, nakon što osoba otvori pismo udahnut će spore i one će se naći u povoljnim uvjetima, te će nastaviti svoj životni ciklus. Stoga su ove bakterije u forenzičnom istraživanju bitan trag, te mogu upućivati na bioterorizam, koji će biti objašnjen kasnije. Bakterije roda *Clostridium* su anaerobne, gram-pozitivne, sporogene bakterije koje prvenstveno žive u tlu, ali nalaze se i u probavnom traktu sisavaca. Vršu fermentaciju aminokiselina i nukleinskih kiselina koje su zastupljene u raspadu životinja, stoga su ove bakterije zastupljene u mikrobiološkoj zajednici leša sisavaca. (Carter i sur. 2017).

Bakterije mliječno-kiselog vrenja naziv su dobile po krajnjem produktu fermentacije, mliječnoj kiselini. Često se koriste u proizvodnji i zaštiti hrane. Većinom su gram-pozitivne bakterije, okruglog oblika i anaerobne ili aerotolerantne. *Streptococcus* i *Lactococcus* su karakterističnog okruglog oblika, te ih često ih povezujemo sa zubnim karijesom (Slika 2.).



Slika 2. (a) *Streptococcus* sp, skenirajući elektronski mikroskop. i (b) *Lactococcus lactis*, fazno kontrastni mikroskop. Promjer obje stanice je 0,5 do 1 μm . (Madigan i sur. 2012).

Rod *Enterococcus* svrstan je u fekalne bakterije. Ako u istraživanju pronađemo tekućinu za koju ne znamo od kud potječe, te molekularnim analizama utvrdimo da je iz roda *Enterococcus* možemo zaključiti da se radi o urinu

U ostale *Firmicutes* se svrstavaju *Staphylococcus* i *Micrococcus* koji se nalaze na ljudskoj koži, tlu i prašini. Preživljavaju u uvjetima visoke koncentracije soli pa su dobar trag zločina u slanom okolišu.

4.3. *PROTEOBACTERIA*

Najpoznatije su zbog primjene u medicini, industriji i poljoprivredi. U nastavku teksta koljeno je podijeljeno prema odgovarajućim funkcijama koje su bitne u forenzici (Carter i sur. 2017).

Enterične bakterije su većinom homogena filogenetička grupa unutar razreda *Gammaproteobacteria*. Fakultativno anaerobne su, gram-negativne, nesporogene, te vrše fermentaciju šećera. Žive u vodi, tlu, a najpoznatije su po prisustvu u probanom traktu ljudi i nekih životinja. Najpoznatije su *Escherichia coli*, koju nalazimo u probavnom traktu, te *Proteus sp.*, koja se veže uz uterinu infekciju i pri privlačenju muha u procesu razgradnje (Carter i sur. 2017).

Pseudomonas je rod unutar razreda *Gammaproteobacteria*. To je gram-negativna, kemoorganotrofna bakterija koja živi u tlu i u vodenom okolišu. Neke od ovih bakterija su patogene, izazivaju razne bolesti kod ljudi. Bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* povezujemo s urinarnim i dišnim infekcijama, no u normalnim uvjetima se može pronaći i na koži. Izrazito je otporna na antibiotike pa je liječenje zaraženih osoba otežano. Bakterije ovog roda preživljavaju u uvjetima niske razine hranjivih tvari, te su idealni stanovnici leša u krajnjim fazama raspada gdje manjka hranjivih tvari jer su već iskorišteni tj. razgrađeni.

Nitrifikacija je proces u kojem se amonijak prevodi u nitrite, a potom u nitrate. Nitrifikacijske proteobakterije su raširene u tlu i vodi gdje se razmnožavaju u uvjetima visoke koncentracije amonijaka, stoga su im grobnice i kanalizacija idealna staništa (Carter i sur. 2017).

Metilotrofne bakterije koriste isključivo C1 spojeve (metanol, format i formamid). Metanotrofne bakterije mogu oksidirati jedino metan. Metan se može pronaći u anoksičnim uvjetima kao što je probavni trakt sisavaca, ostacima raspada, vlažni okoliš i odlagalište smeća. Jedan od poznatijih rodova je *Methylobacterium*, često je prisutan u toaletima i kadama gdje raste na zavjesama za tuš, fugama i u wc školjkama, te formira ružičasti biofilm (Madigan i sur. 2012).

Sulfat reducirajuće bakterije su sposobne u anaerobnim uvjetima reducirati sulfate do sumporovodika. Redukcija im služi isključivo za energiju, a za rast koriste neke druge spojeve

kao što su acetat, masne kiseline. S forenzičnim istraživanjem povezuje ih prepoznatljiv miris trulih jaja, tj. sumporovodika.

Istraživanjem ljudskih leševa dolazi se do zaključka da je većina bakterija pronađenih na tijelu potekla iz tog tijela, tj. to su bakterije koje su uobičajeni stanovnici ljudskog probavnog trakta, usne šupljine, kože i drugih organa. Jedno od rijetkih istraživanja koje je koristilo prave ljudske leševe (ne surogate) je istraživanje Hyde i suradnika (2013) koji su mjerili količinu i raznolikost mikroorganizama u ustima, rektumu i unutrašnjim organima u dva ljudska leša između faze napuhnutosti i truljenja. *Firmicutes* i *Proteobacteria* su bili prisutni po cijelom tijelu. Uzorci uzeti iz donjeg dijela gastrointestinalnog trakta i donjeg dijela tijela sadrže puno *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eggerthella* i *Bacteroides*.

5. UTAPANJE I DIJATOMEJE

Otkrivanjem trupla pokraj obale rijeke, jezera, mora ili nekog drugog oblika vode, sumnja se da je uzrok smrti utapanje. Kada se sa sigurnošću na temelju fizičkih dokaza ne može utvrditi primaran uzrok smrti, analizom mikroorganizama u plućima može se utvrditi točan uzrok smrti kao i približno odrediti mjesto utapanja. Utapanje pripada u skupinu nasilnih smrti zbog brze eliminacije kisika. Ova skupina nasilnih smrti poznata je kao brza anoksija i obuhvaća nekoliko različitih fizikalnih i biokemijskih načina inhibiranja ulaska, transporta i korištenja kisika u tijelu. Primarno se kod tijela izvađenog iz vode treba zaključiti radi li se o utopljeniku ili o mrtvom tijelu odbačenom u vodu.

Proces utapanja se dijeli na dvije faze: faza imerzije i faza gušenja. U fazi imerzije grleni poklopac je ispod površine tekućine, u dišne puteve ulazi tekućina, refleksno se zatvara grkljan (laringospazam), naglo prestaje ulaz tekućine u dišni sustav, ali dolazi do gutanja velike količine tekućine što izaziva distenziju želuca i potiskivanje dijafragme, tj. dolazi do povraćanja. Prema istraživanjima djeca se bore za dah 10 do 20 sekundi, a odrasli oko 60 sekundi, no to ovisi i o temperaturi vode, u hladnijoj vodi ovaj interval traje znatno kraće. Druga faza je faza gušenja koja počinje gubitkom svijesti (3 minute od potapanja), popušta laringospazam i dolazi do ulaska tekućine u pluća, gdje se miješa s prisutnim zrakom i služi stvarajući pjenu koja u alveolama onemogućava izmjenu kisika i ugljikovog dioksida (cerebralna hipoksija), disanje prestaje, a srce još radi 3 do 5 minuta.

Proces utapanja ovisi slanosti vode u kojoj se nalazi žrtva. U slatkoj vodi smrt nastupa prije jer voda ulazi u krv, naspram krvi je hipotonična stoga dolazi do ulaska vode u eritrocite koji se raspuknu, stoga smrt slijedi nakon 2 do 4 minute. U slanoj vodi (moru) tekući dio iz krvi ulazi u pluća, eritrociti se smežuraju, a pluća oteknu, te dolazi do zatajenja srca, smrt slijedi nakon 6-7 minuta.

U slučajevima utapanja napravi se analizu dijatomeja. Dijatomeje žive u tekućinama i karakteristične su za različita područja. Prodiranjem vode u tijelo utopljenika vrši se pritisak na plućnu šupljinu i dolazi do razaranja alveola. Kako su alveole prožete gustim spletom kapilara, a dijatomeje su dovoljno sitne da prođu kroz pore u kapilarama, lako ulaze u krvotok te cirkulacijom mogu doći do ostalih organa (srca, jetre, bubrega, mozga i koštane srži). Ako se u plućima otkrije krvarenje, može se zaključiti da se žrtva „borila za dah“ tijekom utapanja i takav slučaj je čest prilikom nasilnih utapanja. Prilikom prolaska algi krvotokom kroz tijelo njihove ljušturice se talože u organima, a najpogodnija za ekstrakciju ljušturica prilikom istraživanja je koštana srž jer su ostali organi često oštećeni ili u fazi raspadanja. Koštana srž se tretira vrućim dušičnim kiselinama, određenim enzimima ili se spaljuje te se specifičnim postupcima izdvoje ljušturice dijatomeja nakon što se koštano tkivo ukloni. Za utvrđivanje mjesta ubojstva analizirat ćemo dijatomeje iz respiratornog sustava, krvožilnog sustava i drugih (<http://biologija.com.hr/modules/AMS/article.php?storyid=8273>).

Tablica 1. Popis dijatomeja koje može pronaći u organima utopljenika

ORGAN	ČESTO PRONAĐENE DIJATOMEJE	VRSTE
Pluća	<i>Achanthes cyclopuncta</i> , <i>Navicula</i>	<i>minutissima</i> , <i>Fragilaria brevistriata</i> , <i>Cyclotella</i>
Koštana srž	<i>Stephanodiscus parvus</i> , <i>Navicula</i> , <i>Diatoma</i>	
Jetra	<i>Achanthes placentula</i> , <i>lanceolata</i>	<i>minutissima</i> , <i>Fragilaria ulna</i> , <i>Cocconeis</i> , <i>Navicula</i>
Želudac	<i>Achanthes Cyclopuncta</i> , <i>Gomphonema minutum</i>	<i>minutissima</i> , <i>Cyclotella</i>
Bubreg	<i>Achnanthes seminulum</i>	<i>biasoletiana</i> , <i>Navicula</i>
Crijevo	<i>Astrionella formosa</i> , <i>Cyclotella comensis</i> , <i>Gomphonema pumilum</i> , <i>Nitzschia pura</i>	

6. GLJIVE U FORENZICI

Gljive su velika i raširena skupina u koju pripadaju plijesni (Slika 3.), gljive i kvasci. Opisano je oko 100 000 vrsta gljiva, a postoji ih oko 1.5 milijuna. Imaju jedinstvene karakteristike koje su korisne za forenziku. Većina vrsta gljiva stvaraju spore koje se lako prenose. Gljive imaju drugačija biološka svojstva, reprodukciju i evolucijske karakteristike u odnosu na druge patogene. Gljive su povezane sa svim fazama razgradnje tijela nakon smrti. Zanimljivo je da su kvasci poput *Candida albicans* prirodno prisutni na ljudskoj koži i crijevima, te će nakon smrti slijediti i njihova smrt. U procesu razgradnje proizvode velike količine post mortem alkohola etanola, te zbog toga otežavaju forenzičnu istragu u prometnim nesrećama u kojima se sumnja da je žrtva ili osumnjičenik pod utjecajem alkohola. Ovaj proces se može zaustaviti dodatkom natrijevog fluorida koji zaustavlja daljnju proizvodnju etanola i prisustvo *C. albicans* (Gunn, 2009).



Slika 3. Ljudsko tijelo prekriveno plijesni. Tijelo je prvo balzamirano i zakopano pa je nakon par mjeseci izvađeno zbog forenzičnog istraživanja. (Gunn 2009).

Neke gljive proizvode mikotoksine koji su letalni i/ili imaju karcinogeni učinak (Budowle i sur. 2010). Mikotoksini su sekundarni metaboliti koje izlučuje gljiva da bi se obranila od predatora. Mikotoksine oslobađaju gljive tijekom života i/ili nakon smrti, a zatim

se raspršuju u okolni supstrat, stoga se mogu pojaviti u područjima u kojima nema gljiva. Ova značajka otežava procjenu sigurnosti toksičnosti tvari. Gljivica *Aspergillus flavus* je saprotrofna i patogena gljiva s kozmopolitskom raspodjelom. Najpoznatija je zbog kolonizacije žitarica, mahunarki i orašastih plodova. Proizvodi mikotoksine koji se nazivaju aflatoksini, te su kancerogeni za većinu sisavaca. Za vrijeme predsjednika Saddama Husseina u Iraku provodilo se istraživanje s aflatoksinima ovih gljiva kao biooružje.

Psilocibinske gljive su gljive koje u sebi sadrže psihoaktivne spojeve psilocin i psilocibin. Poznate su pod popularnim nazivom “čarobne gljive”, te se smatraju psihodeličnom drogom. Neke od najpoznatijih psilocibinskih gljiva su *Psilocybe Cubensis* (Slika 4.)(najčešće kultivirana i konzumirana), *Psilocybe Semilanceata* (veoma male gljive iz hladnijih predjela), *Psilocybe Azurescens* (vjerojatno najpotentnije) i *Psilocybe Cyanescens*. U pojedinim europskim državama posjedovanje i osobna konzumacija legalni su ili dekriminalizirani, dok je u Hrvatskoj, tretiraju kao kazneno djelo, stoga je bitna njihova forenzična analiza.



Slika 4. *Psilocybe Cubensis* (<http://mushroomobserver.org/138685>)

7. PRIKUPLJANJE UZORAKA

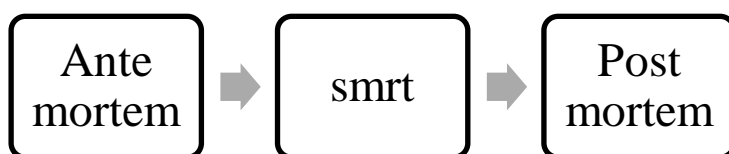
Prilikom sakupljanja forenzičkih dokaza potrebno je nositi rukavice, čizme, pregače/odijela, zaštitne naočale, kirurške maske i prekrivač za kosu kako bi se smanjila kontaminacija i izloženost potencijalnim patogenima (Slika 5.). Svi materijali koji dolaze u dodir s uzorkom moraju biti sterilni i moraju biti konstruirani tako da se izbjegne bilo kakav dodir s nesterilnim okolišem. Uzorci kukaca, tla, tkiva (odvojeno) mogu se staviti u sterilne staklene bočice, tube ili mikrocentrifugalne tube ovisno o broju prikupljenih uzoraka. Sve prikupljene uzorke za mikrobne analize treba sačuvati u 96-100% etanolu ili odmah smrznuti ($<-20^{\circ}\text{C}$). Najvažnije, spremnici uzoraka trebaju biti odgovarajući označeni koristeći sljedeće informacije: datum, vrijeme, identifikacijski broj uzorka, broj slučaja (ako je primjenjivo), zemljopisno mjesto (GPS koordinate) i ime ili inicijali sakupljača. Poželjno je da ista osoba sakuplja sve uzorke.



Slika 5. Prikaz sakupljanja forenzičkih dokaza na ljudskom lešu (preuzeto i prilagođeno iz Carter i sur. 2017).

8. PROCJENA POST MORTEM INTERVALA

Post mortem interval (PMI) je vrijeme koje je prošlo od kad se dogodila smrt, u forenzičnim istraživanjima trenutno analizira pomoću tafonomije (znanstvena disciplina koja se bavi istraživanjem geoloških i bioloških procesa koji se odvijaju između smrti nekog organizma i njegovog konačnog stanja u stijeni) i pomoću organizama koji su nastanili ljudske ostatke.

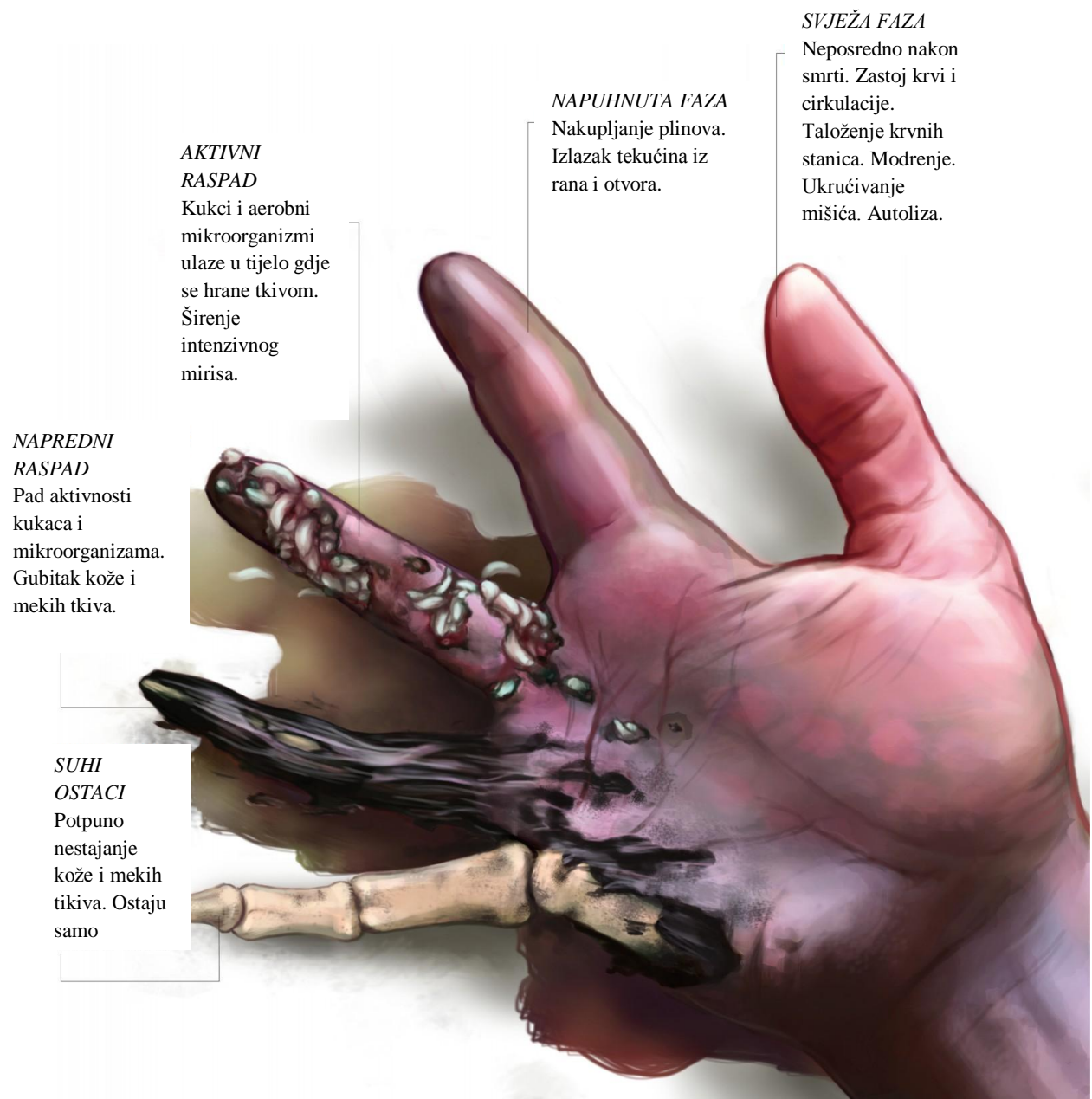


Grafikon 5. Slijed smrti

Vrijeme smrti je izuzetno bitan trag koji povezuje žrtve s osumnjičenikom. U određivanju vremena smrti mogu se koristiti beskralježnjaci (većinom zajednica člankonožaca), te u kojoj fazi je tijelo u raspadanju. Faze raspada ljudskog tijela se dijele na svježu fazu, napuhnutu fazu, fazu truljenja (putrefakcija) i fazu suhih ostataka. Za svaku fazu postoje određeni znakovi kako je raspoznati (Tablica 1. i Slika 5.).

Tablica 2. Prikaz karakteristika povezanih uz fazu raspada ljudskog tijela

FAZA RASPADA	KARAKTERISTIKE
Svježa	Hlađenje tijela, autoliza, hipostaza, lovor mortis, rigor mortis
Napuhnuta	Promjena boje kože, oticanje tijela, izlazak jezika, curenje tekućina, razgradnja tkiva
Putrefakcija	Gubitak kože i mekih tkiva, izlazak plinova, aktivnost mikroorganizama i kukaca pada
Suhi ostaci	Razlaganje usporeno, gube se maternica, prostata, tetive, hrskavica, nokti, kosa, kostur se dezintegrira



Slika 6. Opis faza raspada na slici ljudske ruke
(Preuzeto: <https://www.nzgeo.com/stories/game-over/>)

Čimbenici koji mijenjaju brzinu raspadanja: geografska lokacija, vrijeme, godine, izloženost suncu, zaštićenost (pokrivenost), zakopanost, obješenost, potopljenost, rane i infekcije, izloženost vatri i kemikalijama. U vrućim uvjetima raspadanje tijela se odvija puno brže, u hladnijim uvjetima pak puno sporije, ako je osoba imala rane ili infekcije također se raspada brže, stoga sve te parametre treba uzeti u obzir tijekom istraživanja. Razvojem novih tehnika sekvenciranja moguće je odrediti koji su mikroorganizmi prisutni na lešu, pa je postupak procjene PMI postao još lakši.

Za znanstvena istraživanja nije pogodno koristiti ljudske leševe pa se koriste surogati, kao što su svinja ili miš. Analizom kože svinjskog leša koje je pomaknuto 2-3 sata nakon smrti u šumu je utvrđeno da 70% mikroorganizama pronađenih na lešu pripada koljenu *Proteobacteria* i 20% koljenu *Firmicutes*. Uzorci uzeti od prvog do trećeg dana sadrže 40% *Proteobacteria*, 40% *Firmicutes*. Uzorci prikupljeni petog dana pak sadrže oko 5% *Proteobacteria* i 95% *Firmicutes*. Stoga ovaj omjer možemo koristiti u određivanju faze raspada organizama koji se pronašao u istim uvjetima na istom mjestu. Procjena PMI pomoću mikroorganizama još jedan je bitni faktor u rješavanju zločina.

9. BIOTERORIZAM

Bioterorizam uključuje upotrebu mikroorganizama i njihovih toksina s nakanom ozljeđivanja, razbolijevanja ili ubijanja ljudi ili životinja, zbog osobnih, političkih ili socijalnih razloga (Primorac i sur. 2008). Uzročnici koji se mogu primijeniti u bioterorizmu klasificirani su u tri kategorije: A-, B- i C-kategorija. Uzročnici A-kategorije se lako prenose, uzrokuju visoki mortalitet i imaju veliki javnozdravstveni učinak (Tablica 3.). Uzročnici B-kategorija rezultiraju srednjom stopom morbiditeta i niskom stopom mortaliteta, te zahtijevaju poseban nadzor bolesti. Uzročnici C-kategorije uzrokuju emergentne zarazne bolesti koji se lako prenose zbog lake proizvodnje, a potencijalno mogu uzrokovati visoke stope morbiditeta i mortaliteta, te veliki zdravstveni šok (Primorac i sur. 2008).

Tablica 3. Neki od uzročnika koji se mogu primijeniti u bioterorizmu podijeljeni po kategorijama (preuzeto i prilagođenom na temelju Primorac i sur. 2008).

A-KATEGORIJA	B-KATEGORIJA	C-KATEGORIJA
Antraks (<i>Bacillus anthracis</i>)	Bruceloza (<i>Brucella species</i>)	Emergentne zarazne bolesti urokovane npr. virusom <i>Nipah</i> ili hantavirusima
Botulizam (<i>Clostridium botulinum</i> toksin)	Epsilon-toksin (<i>Clostridium perfringens</i>)	
Kuga (<i>Yersinia pestis</i>)	Uzročnici koji se prenose hranom (<i>Salmonella sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shigella</i>)	
Virusne vrućice (Ebola, Marburg, Lassa, Machupo)	Sakagija (<i>Burkholderia mallei</i>)	
	Melioidoza (<i>Burkholderia pseudomallei</i>)	
	Psitakoza (<i>Chlamydia psittaci</i>)	
	Q-vrućica (<i>Coxiella burnetii</i>)	
	Epidemični pjegavac (<i>Rickettsia prowazekii</i>)	

Jedan od najpoznatijih bioloških zločina dogodio se 1994. godine kada je gastroenterolog namjerno ubrizgao svojoj djevojci virus HIV-a i hepatitisa C, tvrdeći kako joj daje vitamin B. Žrtva se 1995. godine testirala i doznala da je HIV pozitivna, iako je 1994. bila HIV negativna. Testirajući njene bivše seksualne partnere došli su do zaključka da se nije mogla, te nije imala doticaja s HIV prenositeljima. 1994. godine u zapisima gastroenterologa se navodi da je izvadio krv HIV pozitivnoj osobi. Nakon analize virusa zaražene djevojke i pacijenta kome je izvađena krv, utvrđeno je podudaranje virusa HIV-a. Počinitelj je optužen za pokušaj ubojstva drugog stupnja.

Drugi poznatiji bioteroristički napad dogodio se u SAD-u u rujnu 2001. godine. Dana 18. rujna i 9. listopada poslana su po dva pisma (Slika 6.) koja su sadržavala spore antraksa u uredništvo NBC-a i New York Posta, a zatim dvojici američkih senatora. Kao rezultat toga zaraženo je dvadeset dvoje ljudi, kožnim i plućnim antraksom, od čega je petero ljudi umrlo, a počinitelji nikada nisu otkriveni.



Slika 7. Pisma sa sporama antraksa

(<https://911reports.files.wordpress.com/2008/08/anthraxwrittenletters.jpg>)

10. ZAKLJUČAK

Moderniji pristup u mikrobiologiji i mikrobiološkoj ekologiji omogućio je razvoj forenzičnih znanosti. Mikroorganizmi u forenzici imaju znatnu ulogu u procesu razgradnje, ponajviše u tlu jer je tamo najzastupljeniji ovaj proces. U mnogim istraživanjima najčešće se spominju bakterije *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Istraživanjem ljudskih leševa dolazi se do zaključka da je većina bakterija pronađenih na tijelu potekle iz tog tijela. Bilo kakva promjena ove bakterijske zajednice može upućivati na neko trovanje ili neki drugi događaj povezan s ubojstvom. Zanimljivo je da svaka osoba ima različitu bakterijsku zajednicu na koži ili slini, stoga se mogu koristiti kao identifikacijski dokaz. Razvojem mikrobioloških profila olakšalo bi se povezivanje ljudi, životinja, biljaka i drugih objekata međusobno i s geografskim regijama u kojima se nalaze.

U slučaju utapanja analiziraju se dijatomeje pronađene u plućima, krvi, organima ili koštanoj srži utopljenika, te se može zaključiti da li je osoba ubijena namjerno ili je rezultat nesretnog slučaja.

Gljive u forenzici ponekad mogu biti loše jer ispuštaju alkohol tijekom razgradnje, te mogu biti lažni trag u slučaju ispitivanja konzumiranja alkohola od strane stradalog. Neke mogu stvarati spore koje su za ljude kancerogene, a druge se pak mogu imati psihoaktivni učinak, te se koriste kao droga.

Istraživanje prikupljenih tragova ne bi bilo dobro da osobe koje njima rukuju nisu prikladno obučene tj. moraju se pridržavati pravila kako bi se izbjegla kontaminacija, te moraju znati adekvatno skladištiti prikupljeni uzorak koji ide dalje na analizu. Prilikom analize potrebno je odrediti koliko je vremena prošlo od kad je osoba umrla (post mortem interval).

I na kraju, mikroorganizmi se mogu iskoristiti kao biološko oružje za masovno uništenje koje djeluje putem patogenih mikroorganizama (bakterija, virusa, toksina ili drugih organizama koji izazivaju bolesti).

11. LITERATURA

Beecher, D. J. (2006). Forensic application of microbiological culture analysis to identify mail intentionally contaminated with *Bacillus anthracis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5304–5310. <https://doi.org/10.1128/AEM.00940-06>

Budowle, B., Schutzer, S.E., Brezze, R.G., Keim, P.S. & Morse, S.A. (2010). Microbial Forensics, *Academic Press is an imprint of Elsevier*.

Butorac, A., Marić, M., Badanjak Sabolović, M., Hruška, M., Rimac Brnčić, S., & Bačun Družina, V. (2013). Analitičke metode u forenzici hrane Analytical methods in food forensics. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 8(3–4), 90–101.

Carter, D. O., Tomberlin, J. K., Benbow, M. E., & Metcalf, J. L. (2017). *Forensic Microbiology*, Wiley.

Ferenčić, A., Šoša, I., Stemberga, V. i Cuculić, D. (2018). Utapanje u sudskoj medicini – pregled i incidencija kroz 30 godina na Zavodu za sudsku medicinu i kriminalistiku u Rijeci. *Medicina Fluminensis*, 54 (2), 108-117. https://doi.org/10.21860/medflum2018_198210

Fierer, N., Lauber, C. C. L., Zhou, N., McDonald, D., Costello, E. K., & Knight, R. (2010). Forensic identification using skin bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6477–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000162107>

Grice, E. A., Kong, H. H., Renaud, G., Young, A. C., Bouffard, G. G., Blakesley, R. W., ... Segre, J. A. (2008). A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*, 18(7), 1043–1050. <https://doi.org/10.1101/gr.075549.107>

Gunn, A. (2009). Essential Forensic Biology, 2nd Edition, Wiley.

Hampton-Marcell, J. T., Lopez, J. V., & Gilbert, J. A. (2017, March 1). The human microbiome: an emerging tool in forensics. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 228–230. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12699>

Lax, S., Hampton-Marcell, J. T., Gibbons, S. M., Colares, G. B., Smith, D., Eisen, J. A., & Gilbert, J. A. (2015). Forensic analysis of the microbiome of phones and shoes. *Microbiome*, 3(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0082-9>

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2012). Brock Biology of Microorganism, *Pearson*.

Mohammadipanah, F., & Wink, J. (2016). Actinobacteria from arid and desert habitats: Diversity and biological activity. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01541>

Primorac, D. & suradnici (2008). Analiza DNA u sudskoj medicini i pravosuđu, *Medicinska naklada*, Zagreb.

Primorac, D., Primorac, D., Butorac, S. i Adamović, M. (2009). Analiza DNA u sudskoj medicini i njezina primjena u hrvatskome kaznenopravnom sustavu. *Hrvatski ljetopis za kazneno pravo i praksu*, 16 (1), 3-26.

Tridico, S. R., Murray, D. C., Addison, J., Kirkbride, K. P., & Bunce, M. (2014). Metagenomic analyses of bacteria on human hairs: A qualitative assessment for applications in forensic science. *Investigative Genetics*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s13323-014-0016-5>

Vass, A. A. (2012). Odor mortis. *Forensic Science International*, 222(1–3), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.06.006>

Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576–4579. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.12.4576>

Xu, F.-F., Morohoshi, T., Wang, W.-Z., Yamaguchi, Y., Liang, Y., & Ikeda, T. (2014). Evaluation of Intraspecies Interactions in Biofilm Formation by *Methylobacterium* Species Isolated from Pink-Pigmented Household Biofilms. *Microbes and Environments*, 29(4), 388–392. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14038>

Yano, T., Kubota, H., Hanai, J., Hitomi, J., & Tokuda, H. (2012). Stress Tolerance of Methylobacterium Biofilms in Bathrooms. *Microbes and Environments*.
<https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12146>

<http://www.forenzika.hr/>

<http://forenzika.unist.hr/>

https://hr.wikipedia.org/wiki/Psilocibinske_gljive

<http://mushroomobserver.org/138685>

12. SAŽETAK

Forenzična znanost uključuje upotrebu znanosti u istraživanjima pravnih i političkih pitanja. Mikrobiološka forenzika je znanstvena disciplina posvećena analizi mikroorganskih dokaza iz bioterorizma, biozločina ili tragova vezanih uz druge zločine.

U ovom radu izložen je kratki pregled mikroorganizama, ponajviše bakterija, gljiva i dijatomeja uključenih u forenzična istraživanja. U istraživanjima se najčešće spominju bakterije reda: *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. U slučaju utapanja najbitnije su dijatomeje, a gljive su uz bakterije glavni stanovnici ljudskih i životinjskih leševa. Najvažnije je pravilno prikupiti uzorke, te odrediti post mortem interval, nakon čega možemo zaključiti o kakvoj se vrsti zločina radi. Primjena mikroorganizama i njihovih toksina s nakanom ozljeđivanja, razbolijevanja ili ubijanja ljudi, životinja ili biljaka, područje je kojim se bavi bioterorizam.

13. SUMMARY

Forensic science involves the application of science to the investigation of legal and policy matters. Microbial forensics is a scientific discipline dedicated to analyzing microorganisms evidences from a bioterrorism , biocrime, or traces of other crimes.

This paper presents a brief overview of microorganisms, mostly bacteria, fungi and diatoms involved in forensic investigations. There are three phyla that have been observed regularly: *Actinobacteria*, *Firmicutes* i *Proteobacteria*. In the case of drowning the most important is diatoms. Fungi and bacteria are the main inhabitants of human and animals corpses. It is most important to collect the samples correctly and to determine the post-mortem interval, after which we can conclude what kind of crime it is. The application of microorganisms and their toxins with the intent of injuring, abusing or killing people, animals or plants, is an area of bioterrorism.